

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 77 11148

(54) Dipyrido-[4,3-b]-[3,4-f]-indoles, procédé d'obtention application thérapeutique et compositions pharmaceutiques les contenant.

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). C 07 D 471/14; A 61 K 31/44.

(22) Date de dépôt 13 avril 1977, à 16 h 9 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 45 du 10-11-1978.

(71) Déposant : Etablissement public dit : AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA
RECHERCHE (ANVAR), résidant en France.

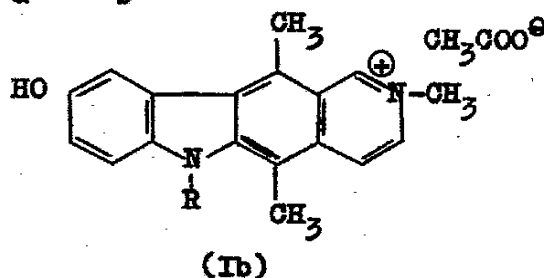
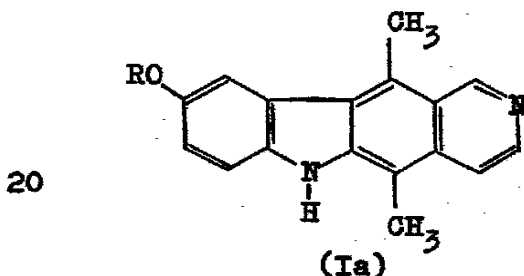
(72) Invention de : Emile Bisagni, Claire Ducrocq, Christian Rivalle, Pierre Tambourin, Françoise
Wendling, Jean-Claude Cherman et Luc Montagnier.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR).

La présente invention, à la réalisation de laquelle ont participé Monsieur Emile BISAGNI, Mademoiselle Claire DUGROGQ, Monsieur Christian RIVALLÉ, Monsieur Pierre TAMBOURIN et Mademoiselle Françoise WENDLING de la Fondation CURIE, - Institut du Radium - ainsi que Messieurs Jean-Claude CHERMANN et Luc MONTAGNIER de l'INSTITUT PASTEUR, concerne des dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indoles et un procédé pour leur obtention. L'invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques contenant les dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indoles ainsi que les applications thérapeutiques de ces derniers.

On sait que la 9-méthoxy-ellipticine, son dérivé O-déméthylé et, surtout, l'acétate/2-N-méthyl-9-hydroxy-elliptichium, présentent des propriétés thérapeutiques intéressantes dans le domaine de la cancérologie; ces composés sont des pyrido [4,3-b] carbazoles de formule générale I_a et I_b



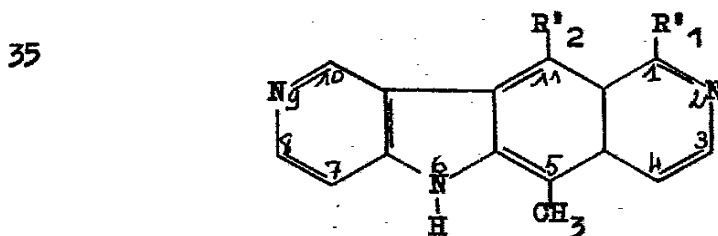
dans lesquelles R représente CH₃ ou H.

A cet effet, on peut se référer aux articles :

- 25 - J.B. LE PECQ, C. GOSSE, NGUYEN DAT XUONG, S. GROS et C. PAOLETTI: Cancer Research 36 p 3067-3076 (1976) et
- J.B. LE PECQ, C. GOSSE, NGUYEN DAT XUONG et C. PAOLETTI: C.R. Acad. Sci. Paris Série D 281 p 1365 (1975).

On a maintenant trouvé des nouveaux composés, les dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indoles, qui présentent également des propriétés thérapeutiques intéressantes dans le domaine cancérologique.

Les dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indoles selon la présente invention répondent à la formule II :



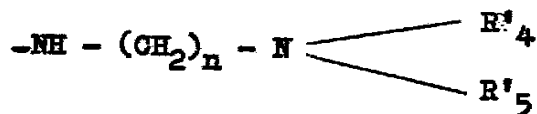
II

dans laquelle : R'_1 est l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe alkyle, de préférence un groupe alkylthio ou alcoxy, un halogène, tel que le chlore, ou un groupe amino; R'_2 est l'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur.

5 Dans la présente description, le terme "alkyle inférieur" désigne les groupes alkyles ayant 1 à 3 atomes de carbone et de préférence le groupe méthyle.

A titre de groupes amino appropriés, on peut citer le groupe de formule :

10



dans laquelle n est égal à 2 ou 3 et R'_4 et R'_5 sont identiques ou différents et représentent chacun un groupe alkyle inférieur; 15 de préférence, les groupes R'_4 et R'_5 sont le groupe méthyle ou le groupe éthyle.

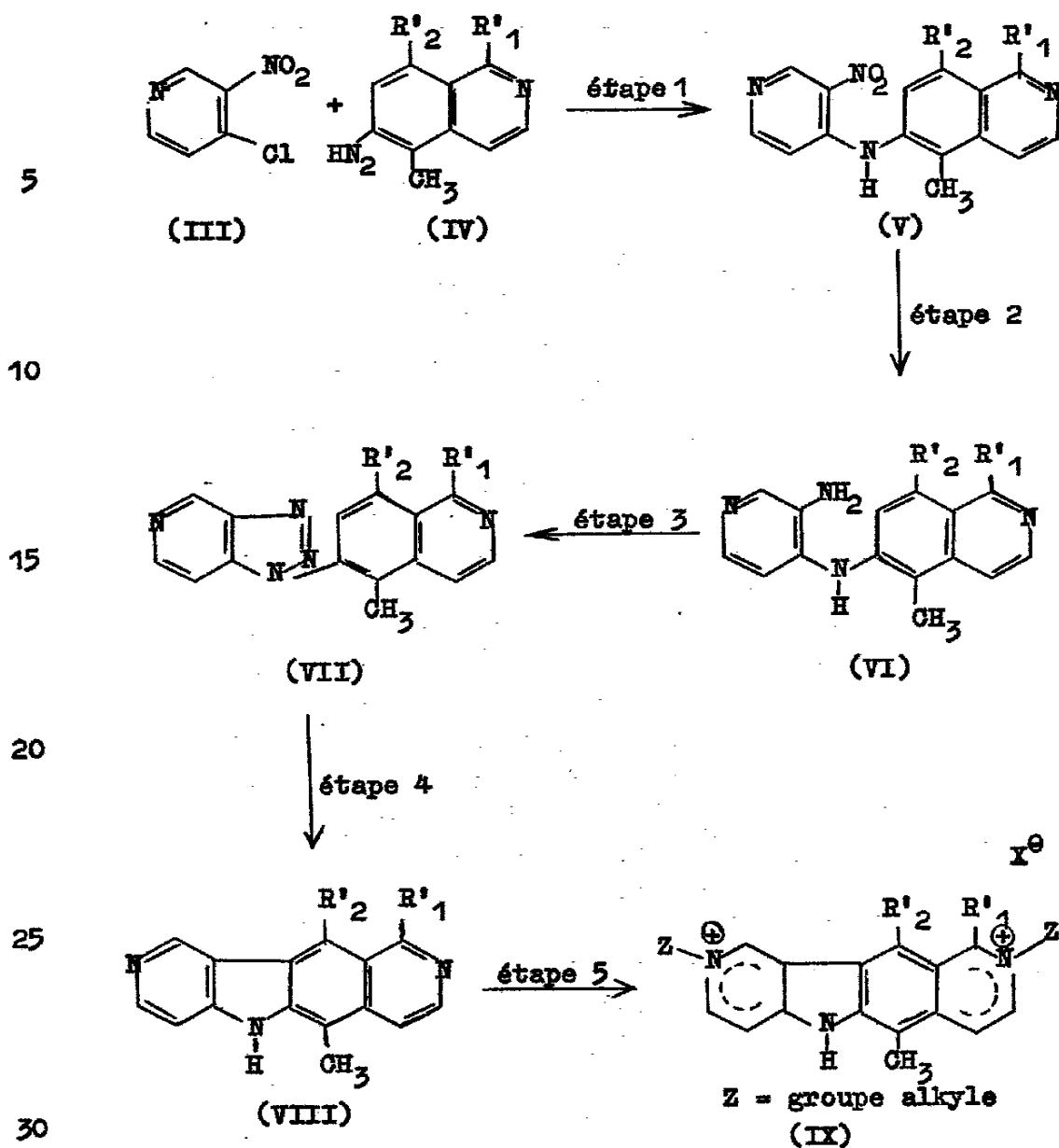
L'invention englobe aussi les sels pharmaceutiquement acceptables des dipyrido-indoles de formule (II) ainsi que leurs formes isomères et tautomères lorsque celles-ci existent.

20 La présente invention concerne aussi un procédé pour l'obtention desdits dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indoles.

Le procédé selon la présente invention consiste :

- 1) à faire réagir une amino-6 isoquinoléine avec la nitro-3 chloro-4 pyridine pour former la [(nitro-3' pyridyl)-4' amino]-6 isoquinoléine correspondante;
- 25 2) à hydrogéner ladite isoquinoléine ainsi obtenue en le composé amino correspondant;
- 3) à faire réagir le composé amino correspondant avec du nitrite de sodium pour former la triazolopyridine correspondante,
- 30 4) à transformer la triazolopyridine ainsi obtenue en le dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole correspondant,
- 5) éventuellement à former le sel pharmaceutiquement acceptable du dipyridoindole ainsi obtenu.

35 Le procédé de l'invention peut être représenté par le schéma réactionnel ci-après :



Les produits de départ mis en oeuvre dans le procédé de l'invention sont donc la nitro-3 chloro-4 pyridine de formule (III) et les amino-6 isoquinoléines de formule (IV).

35 L'étape 1) du procédé de l'invention consiste à condenser la nitro-3 chloro-4 pyridine de formule III avec une amino-6 isoquinoléine de formule IV. Cette condensation peut être réalisée selon différents modes opératoires bien connus de l'homme de l'art, ces modes opératoires variant suivant la nature des substituants R'₁ et R'₂ de l'amino-6 isoquinoléine mise en oeuvre.

40

Ainsi, lorsque l'amino-6 isoquinoléine mise en oeuvre ne comporte pas de substituants hydroxy, on peut opérer de la façon suivante :

5 On dissout l'amino-6 isoquinoléine dans un solvant inerte approprié, tel que le diméthoxy-1,2 éthane, on ajoute une solution d'acide anhydre, tel que l'acide chlorhydrique, dans un solvant anhydre, et ensuite la nitro-3 chloro-4 pyridine. On maintient au reflux le mélange réactionnel ainsi obtenu jusqu'à disparition pratiquement complète de l'un des réactifs, ce qu'on peut détermi-
10 ner par mesure par chromatographie en couche mince; on évapore ensuite le solvant.

Lorsque l'amino-6 isoquinoléine mise en oeuvre comporte un substituant hydroxy, il est avantageux d'opérer à la température ambiante; les composés de départ peuvent être dissous dans un
15 solvant inerte, tel que par exemple le diméthylformamide. On laisse à la température ambiante le mélange réactionnel obtenu par mélange des solutions des deux constituants de départ jusqu'à disparition des composés de départ qui sont visibles en chromatographie en couche mince sur gel de silice. Le précipité formé est
20 ensuite récupéré par des techniques classiques.

On utilise avantageusement des quantités équimolaires ou pratiquement équimolaires des deux composés de départ.

L'étape 2) du procédé selon l'invention consiste en une hydrogénation de la $\text{[(nitro-3' pyridyl)-4' amino]-6 isoquinoléine}$
25 obtenue selon l'étape 1) décrite ci-dessus. Cette hydrogénation est réalisée en présence d'un catalyseur d'hydrogénation, tel que le charbon palladié. La $\text{[(nitro-3' pyridyl)-4' amino]-6 isoquinoléine}$ est dissoute dans un solvant organique, tel que par exemple l'acide acétique; on ajoute à cette solution une quantité appropriée
30 de charbon palladié et on agite en atmosphère d'hydrogène jusqu'à l'absorption théorique d'hydrogène. Le catalyseur est ensuite éliminé par filtration; le solvant est évaporé et le résidu obtenu est recristallisé dans un solvant organique, tel que le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile, le xylène etc.

35 Selon l'étape 3) du procédé selon l'invention, on fabrique la triazolopyridine correspondante en traitant la $\text{[(amino-3' pyridyl)-4' amino]-6 isoquinoléine}$ de formule VI avec du nitrite de sodium. On opère avantageusement de la façon suivante: on dissout la $\text{[(amino-3' pyridyl)-4' amino]-6 isoquinoléine}$ dans un
40 acide organique tel que de l'acide acétique, on refroidit le

mélange obtenu jusqu'à environ 0°C et on ajoute progressivement une solution aqueuse de nitrite de sodium dans le minimum d'eau. Le mélange réactionnel est agité jusqu'à ce que la température revienne à l'ambiante; le précipité formé est ensuite lavé et
5 séché selon des méthodes classiques.

Selon l'étape 4) du procédé de l'invention, on transforme la triazolopyridine obtenue selon l'étape 3) en le dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole correspondant. Au cours de cette transformation, il se produit une ouverture du cycle triazolo et une cycli-
10 sation pour former un dipyrido-indole de formule VIII. Cette opération est réalisée au sein d'un agent inerte, tel que la paraffine ou le phénanthrène, ayant un point d'ébullition assez élevé pour permettre la transformation indiquée, qui s'opère par voie thermique.

15 On opère habituellement à une température de 320-350°C.

Des exemples de mise en oeuvre de cette étape seront donnés ci-après.

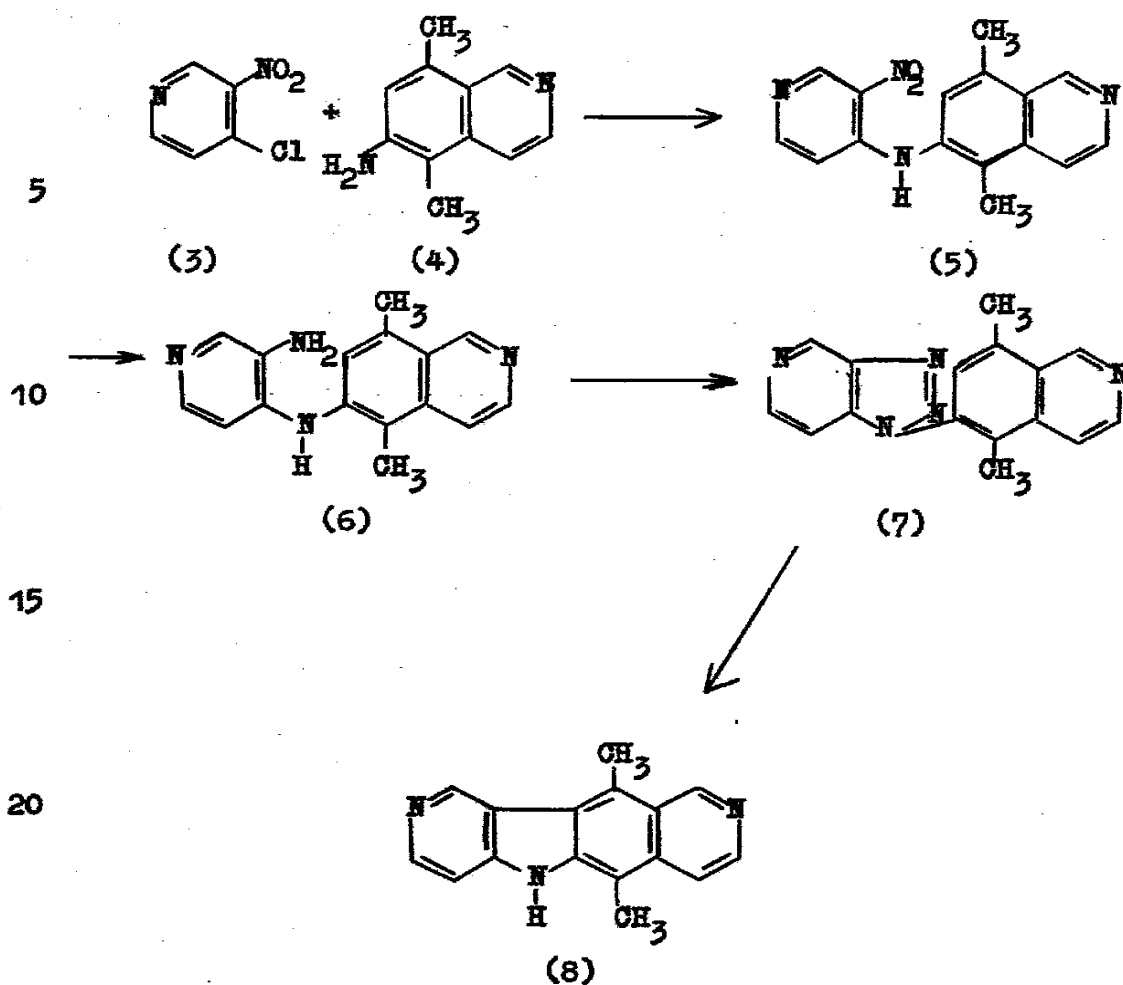
Le dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole ainsi obtenu est ensuite éventuellement transformé en un sel pharmaceutiquement ac-
20 ceptable.

Pour former ces sels pharmaceutiquement acceptables il importera d'utiliser les agents appropriés bien connus de l'homme de l'art, tels que les acides chlorhydrique, bromhydrique, succi-
25 nique, lactique, acétique, phosphorique et tous autres acides communément utilisés pour former de tels sels.

On indiquera ci-après les schémas réactionnels des modes opératoires préférés de mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

Mode opératoire n° 1 :

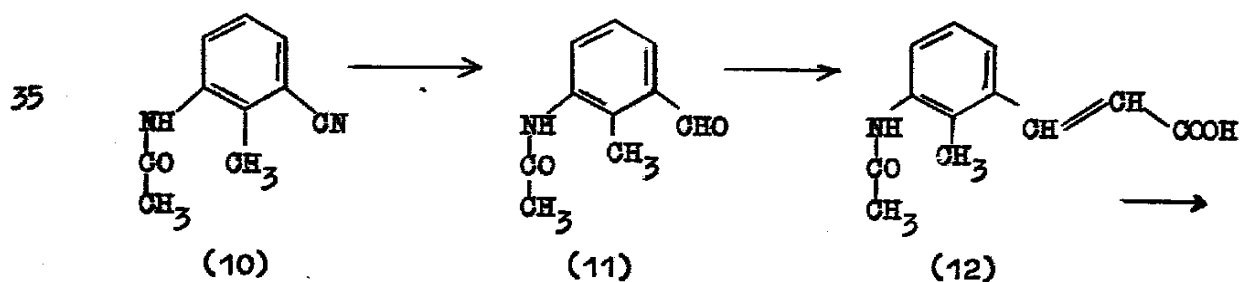
30 Ce mode opératoire est relatif à l'obtention de dipyrido-indoles de formule II ci-dessus dans laquelle R'₁ est l'hydrogène et R'₂ est un groupe alkyle, par exemple le groupe méthyle; ce mode opératoire est représenté par le schéma ci-après pour le composé de formule II dans laquelle R'₂ est un groupe méthyle :

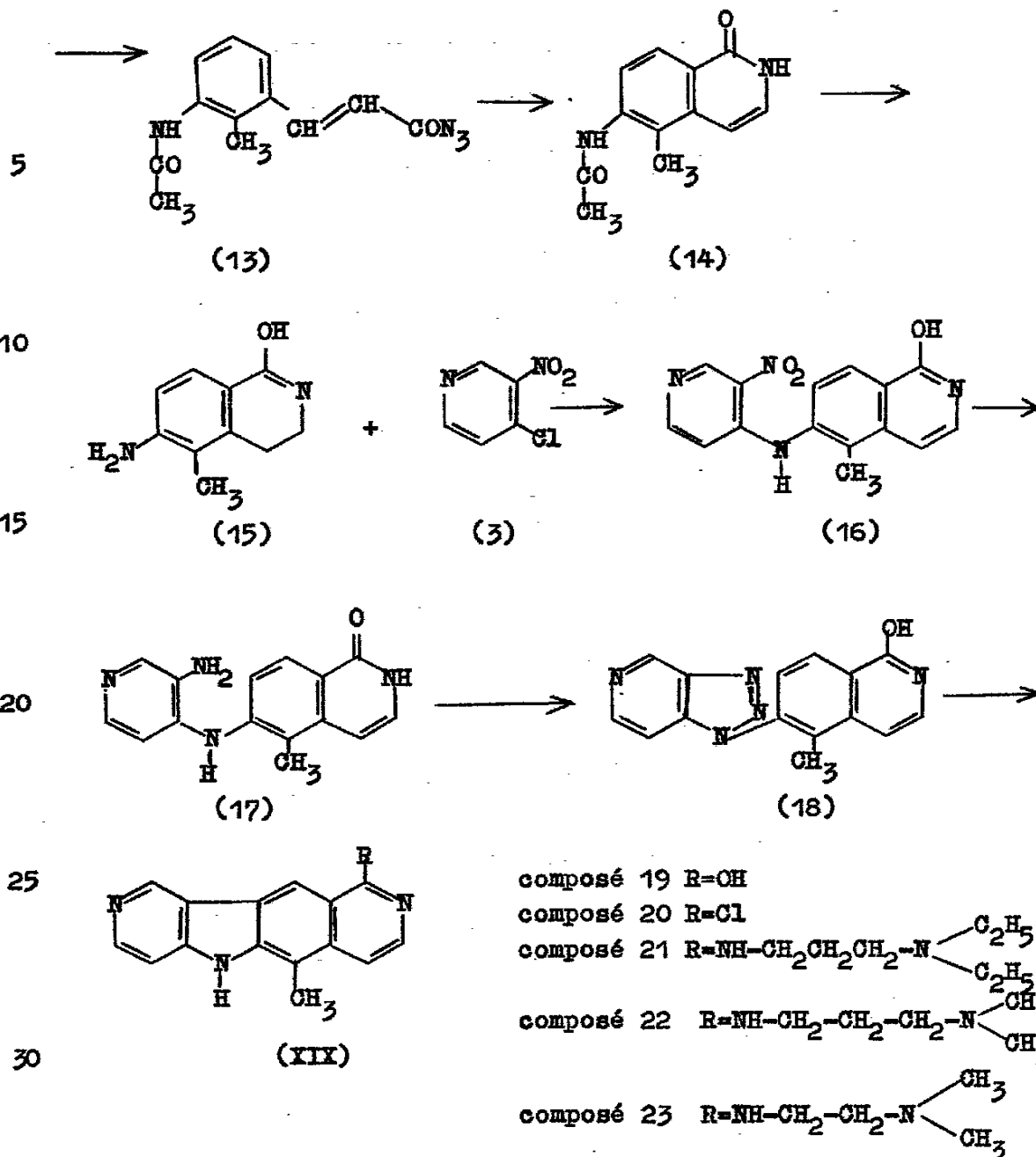


Ce mode opératoire sera illustré par les exemples 1 à 4 ci-après.

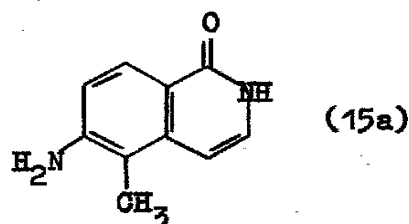
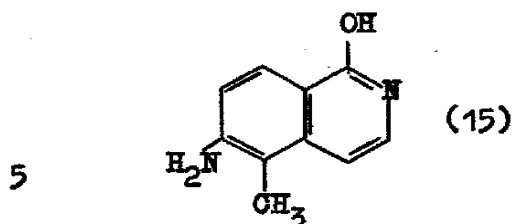
Mode opératoire n° 2

Ce mode opératoire est relatif à l'obtention de dipyrdo-
30 indoles de formules II ci-dessus dans laquelle R'_1 est le groupe hydroxy et R'_2 est l'hydrogène.

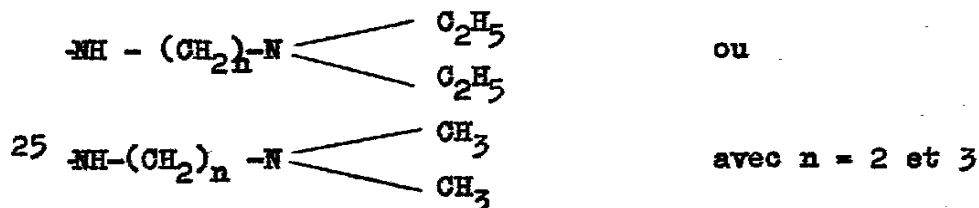




Selon ce mode opératoire, on peut préparer le produit de
35 départ de formule 15 qui peut se présenter sous sa forme tauto-
mère (15a):



à partir du méthyl-2 amino-3 benzonitrile par le procédé qui consiste à transformer le groupe amino de ce composé en le groupe acétylamino pour former le composé de formule (10) ; à transformer ensuite le groupe cyano du méthyl-2 acétylamino-3 benzonitrile en le groupe aldéhyde et à condenser ensuite ce groupe aldéhyde avec l'acide malonique pour former l'acide de formule (12) ; à former ensuite l'azide correspondant (13) ; à effectuer une cyclisation pour former l'isoquinolone correspondante et enfin à éliminer le groupe protecteur du groupe amino pour obtenir la méthyl-5 amino-6 isoquinolone de formule (15). Ensuite, on opère selon le procédé défini précédemment pour obtenir le composé selon l'invention de formule XIX dans laquelle R est le groupe hydroxy (composé 19). On peut ensuite substituer au groupe hydroxy de ce composé un atome de chlore, un groupe amino, tels que par exemple les groupes de formule ci-après, pour obtenir les composés 19 à 23.



Les composés intermédiaires obtenus lors de la mise en oeuvre du mode opératoire ci-dessus font également partie de l'objet de l'invention ainsi que leurs formes isomères et tautomères lorsqu'elles existent.

Parmi les composés de la présente invention, on peut citer tout particulièrement les suivants :

- le diméthyl-5,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;
- le diacétate de tétraméthyl-2,5,9,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indolinium;
- l'acétate du diméthyl-5,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole ;
- le dichlorhydrate du diméthyl-5,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;

- le dihydro-1,2 oxo-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;
- le chloro-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;
- 5 - le (γ -diéthylaminopropyl)amino-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;
- le (γ -diméthylaminopropyl)amino-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;;
- 10 - le (β -diméthylaminoéthyl) amino-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole.

L'invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques antivirales et antitumorales contenant une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé selon l'invention de formule II, en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement inerte. Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent se présenter notamment sous forme de solutions injectables par voie intraveineuse ou intramusculaire.

On a déterminé les propriétés antitumorales des composés selon l'invention par leur action curative sur la leucémie expérimentale greffée L-1210. Cette leucémie a permis en effet de sélectionner de nombreux composés actifs et utilisés en clinique humaine [ZUBROD G.G., Proc. Nat. Acad. Sci. 1972, 69, 1042-1047 et SCHEPARTZ SA. SCREENING, 1971, CANCER Chemother. Rep. Part 3 vol 2, p 3].

25 Cette leucémie est entretenue sous forme ascitique par passage (voie I.P.) sur souris CBD1 (C57 B16 x DBA/2)F1. Les préparations à tester sont injectées par la voie intrapéritonéale 1 jour au moins après la greffe des cellules (1 seule injection). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation du temps de survie (ILS %) selon KESSEL et al., Cancer Res. 1971, 31, 1883-1887) ou encore en pourcentage du nombre de cellules tuées par le produit (la survie des animaux est proportionnelle au nombre de cellules injectées).

On a aussi recherché le pouvoir protecteur des composés selon l'invention sur la leucémie virale induite de Friend [J. Exp. Med. 1957-105 - 307-318] et on a déterminé que les composés selon l'invention sont des agents antiviraux et antitumoraux.

L'étude du développement du sarcome viro induit de MOLONEY [Nat. Cancer. Inst. Monograph 22, 139-142 1966] a également permis de déterminer que les composés selon l'invention sont

des agents antiviraux et antitumoraux.

On a également déterminé la dose toxique et la toxicité aiguë in vivo, c'est-à-dire les doses létales DL 100 et DL 50.

Par ailleurs, on a montré que les composés selon l'invention sont cytotoxiques à des concentrations comprises entre 0,2 et 10 μ M. et que le composé 21 selon l'invention est aussi actif ou plus que des produits actuellement utilisés comme antitumoraux.

L'invention va être maintenant illustrée par les exemples non limitatifs ci-après.

10 EXEMPLE 1

Préparation du diméthyl-5,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole (composé de formule 8)

A - Diméthyl-5,8 (nitro-3'pyridyl)-4' amino 7 -6 isoquinoléine de formule (5)

15 On a dissous 36 g de la diméthyl-5,8 amino-6 isoquinoléine de formule (4) dans 1,5 l de diméthoxy-1,2 éthane; on a ajouté 33,14 g de nitro-3 chloro-4 pyridine de formule (3), puis 95,85 ml d'une solution d'acide chlorhydrique sec dans l'éther titrée à 4,362 M (2 équivalents molaires par rapport à l'amino isoquinoléine de formule (3)).

Après 192 h de chauffage à reflux, le solvant a été évaporé, le résidu a été repris dans 1,5 l d'eau en agitant 1h et le précipité insoluble a été essoré pour donner 1,7 g de nitro-3 hydroxy-4 pyridine.

25 En contrôlant constamment au pH mètre, on a ajouté progressivement à la phase aqueuse du carbonate de potassium et le précipité qui apparaissait à partir de pH 4 a été essoré lorsqu'on a atteint le pH 5,5. Après séchage, celui-ci a été recristallisé dans le benzène et l'on a obtenu ainsi 17,6 g, soit 28,6 %, de microcristaux jaunes, point de fusion : 206°C, correspondant au composé attendu.

<u>Analyse</u> :	$C_{16}H_{14}N_4O_3$	C	H	N
Calculé %		65,29	4,80	19,04
Trouvé %		65,09	4,81	18,86

35 En alcalinisant les eaux-mères jusqu'à pH 10, on a récupéré ensuite 13g, soit 36 %; de l'amino isoquinoléine de formule (4); point de fusion : 149°C après cristallisation.

B - Diméthyl-5,8 (amino-3' pyridyl)-4' amino 7-6 isoquinoléine de formule (6)

40 20 g du dérivé nitré de formule (5) ont été dissous dans

- 1 litre d'éthanol absolu, additionnés de 2 g de charbon palladié à 10 % et l'ensemble a été agité sous atmosphère d'hydrogène à la température et à la pression ambiantes jusqu'à absorption de la quantité théorique d'hydrogène. Après filtration du catalyseur, le solvant a été évaporé et le résidu a été recristallisé dans l'éthanol pour donner 16,9 g (93,7 %) de cristaux beiges, point de fusion = 235-250°C avec décomposition, correspondant au composé attendu cristallisé avec 1/2 mole d'éthanol.

10 Analyse : $C_{16}H_{16}N_4$, $1/2 C_2H_5OH$

	C	H	N
Calculé %	71,05	6,66	19,50
Trouvé %	70,78	6,77	19,18

C - [(diméthyl-5',8' isoquinolyl)-6']-1 triazolo [4,5-c] pyridine de formule (7)

- On a dissous 16,8 g de l'amine de formule (6) dans 300 ml d'acide acétique, refroidi aux environs de 0°C et on y a ajouté progressivement goutte à goutte et en maintenant à froid 4,83 g de nitrite de sodium dissous dans 150 ml d'eau. On a maintenu le mélange réactionnel sous agitation à froid pendant 2 h, puis 1 h en le laissant revenir à la température ambiante; on a évaporé le solvant, repris le résidu dans 300 ml d'eau et filtré le précipité insoluble.

Après recristallisation dans l'éthanol, il s'est formé ainsi 14,8 g, soit 84,5 % de cristaux jaune pâle, point de fusion 215-220°C, correspondant au produit attendu.

25 Analyse : $C_{16}H_{13}N_5$

	C	H	N
Calculé %	69,80	4,76	25,44
Trouvé %	69,67	4,77	25,23

D - Diméthyl-5,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole de formule (8)

- 12 g de la triazolopyridine de formule (7) ont été mélangés avec 39 g de paraffine d'un point de fusion de 54-56°C et l'ensemble a été chauffé en atmosphère d'azote jusqu'à cessation du dégagement gazeux, soit pendant 20 à 25 minutes.

- Après avoir laissé refroidir le mélange réactionnel, on a ajouté 100 ml d'éther de pétrole lourd (point d'ébullition sous pression normale : 100-140°C), on a chauffé jusqu'à l'ébullition et on a essoré le solide noir insoluble. Ce dernier a été repris dans l'éthanol en présence de charbon animal, filtré, concentré et filtré à froid puis recristallisé dans la pyridine pour donner 405,4 g (40,6 %) de microcristaux jaunes, infusibles à 350°C.

Analyse :	$C_{16}H_{13}N_3$	C	H	N
	Calculé %	77,71	5,30	16,99
	Trouvé %	77,52	5,32	16,98

EXEMPLE 2

- 5 Préparation du diacétate de tétraméthyl-2,5,9,11 dipyrrodo
[4,3-b] [3,4-f] indolinium de formule IX [X = CH₃COO]

274 mg du composé de formule (8) obtenu selon l'exemple 1, ont été mis en suspension dans 750 ml d'acétone et chauffés à re-
 10 flux pendant 6 h en présence d'un large excès d'iodure de méthyle (1,42 g). Après addition de la même quantité d'iodure de méthyle, on a chauffé de nouveau au reflux pendant 14 h; on a refroidi ensuite le mélange réactionnel et essoré 487 mg (92 %) du produit insoluble correspondant au diiodure (composé de formule (IX) dans
 15 laquelle X = I).

Analyse :	$C_{18}H_{19}I_2N_3$	C	H	N
	Calculé %	40,68	3,58	7,91
	Trouvé %	40,55	3,67	7,88

450 mg du composé obtenu précédemment dissous dans 100 ml
 20 d'eau ont été passés sur une colonne de résine échangeuse (DOWEX 1X2" chargée en ions acétate et le solvant a été évaporé. Le résidu a été repris dans de l'alcool isobutylique pour donner le produit attendu sous la forme de microcristaux jaune-orangé, d'un point de fusion de 230-235°C. Il a donné une seule tache en
 25 chromatographie sur couche mince d'alumine avec le mélange méthanol-eau (4/1 v/v) comme éluant; le spectre en résonance magnétique nucléaire (RMN) indique qu'il s'agit bien du composé attendu, mais son analyse centésimale correspond au produit voulu partiellement hydraté.

30 EXEMPLE 3

Préparation de l'acétate du diméthyl-5,11 dipyrrodo [4,3-b]
[3,4-f] indole

1 g du composé de formule (8), obtenu selon l'exemple 1, et 20 ml d'acide acétique ont été chauffés à l'ébullition et l'ex-
 35 cès d'acide acétique a été évaporé aussitôt. Le résidu, repris dans l'acétone et filtré, a fourni 1 g de précipité insoluble sous forme de microcristaux ocre jaune, infusibles à 310°C, et correspondant au monohydrate du composé recherché.

Analyse :	$C_{18}H_{19}N_3O_3$	C	H	N
	Calculé %	66,44	5,89	12,92
	Trouvé %	66,58	5,83	12,79

EXEMPLE 4dichlorhydrate du diméthyl-5,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole

- On a dissous 200 mg de la base de formule (8) obtenue
 5 selon l'exemple 1 dans 20 ml d'éthanol absolu, on a ajouté 1 ml d'éthanol saturé par l'acide chlorhydrique et évaporé le solvant au bain marie sous pression réduite. Le résidu a été repris dans l'acétone et essoré pour fournir 200 mg de microcristaux ocres, infusibles à 310°C et correspondant au monohydrate du dichlorhydrate recherché.

Analyse : $C_{16}H_{17}Cl_2N_3O$	C	H	Cl	N
Calculé %	56,80	5,02	21,01	12,43
Trouvé %	56,34	4,78	21,20	12,56

EXEMPLE 5

- 15 Préparation du dihydro-1,2 oxo-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole (composé 19)

A) Méthyl-2 acétylamino-3 benzonitrile de formule (10)

- On dissous 39 g (0,3 mole) de méthyl-2 amino-3 benzonitrile dans 75 ml d'acide acétique, on a ajouté 30 ml (0,3 mole)
 20 d'anhydride acétique, chauffé au reflux pendant 5 minutes, et on a refroidi. Le solide obtenu a été essoré et l'évaporation du solvant a fourni une nouvelle quantité de solide que l'on a jointe au précédent. Après recristallisation de l'ensemble dans le toluène, on a obtenu 44 g (95 %) de paillettes incolores d'un point
 25 de fusion de 160°C.

Analyse : $C_{10}H_{10}N_2O$	C	H	N
Calculé %	68,95	5,79	16,08
Trouvé %	68,82	5,83	15,99

B) Acide méthyl-2 acétylamino-3 cinnamique de formule (12)

- 30 Dans un tricol de 6 l, on a introduit 60 g (0,34 mole) du nitrile de formule (10) et 1 litre d'acide formique dilué à 50 % dans l'eau puis on a chauffé à l'ébullition. En maintenant l'ensemble au reflux, on a ajouté en 5 fois, à intervalles de 30 minutes, 120 g d'alliage de Raney, on a laissé 30 minutes de plus
 35 à reflux et on a filtré les sels et l'excès de réactif insolubles. Le précipité a été lavé à l'eau chaude et l'ensemble du filtrat a été extrait à l'aide de chloroforme, en au moins dix fois avec 500 ml de chloroforme à chaque fois.

- L'évaporation de la phase organique a fourni un résidu
 40 qui a distillé en donnant 39 g d'un produit (Eb₁₁ = 210 - 225°C)

correspondant au mélange du nitrile de départ et de l'aldéhyde de formule (11), c'est-à-dire le méthyl-2 acétylamino-3 benzaldéhyde. Si l'on recristallise dans le benzène ou le toluène, on obtient de fines aiguilles incolores, point de fusion : 124-128°C.

5	Analyse : $C_{10}H_{11}NO_2$	C	H	N
	Calculé %	67,78	6,26	7,91
	Trouvé %	68,07	6,27	8,05

Le mélange précédent (38g), brut de distillation, a été dissous dans 50 ml de pyridine sèche; on l'a ajouté en une seule fois à une solution de 300 ml de pyridine contenant 22,5 g d'acide malonique et 1 ml de pipéridine, et l'ensemble a été chauffé au reflux pendant 1h 30. La pyridine a été évaporée sous pression réduite et le résidu a été traité par une solution de soude en excès en présence de chloroforme.

Après décantation, l'évaporation du chloroforme a fourni un résidu constitué par une fraction de nitrile de départ de formule (10).

L'acidification de la couche alcaline par l'acide chlorhydrique a fourni l'acide acrylique de formule (12), que l'on a recristallisé dans l'acide acétique en donnant 25 g (34 % par rapport à la quantité de nitrile de formule (10) mis en oeuvre) de paillettes incolores, point de fusion = 265-267°C.

20	Analyse : $C_{12}H_{13}NO_2$	C	H	N
	Calculé %	65,74	5,98	6,39
25	Trouvé %	65,58	6,12	6,52

C) Méthyl-2 acétylamino-3 cinnamoylazide de formule (13)

L'acide acrylique de formule (12) (36 g) a été ajouté à une solution de 17 g de triéthylamine dans 150 ml d'acétone et le tout a été refroidi à 0°C. En maintenant la température en dessous de 0°C, on a ajouté, goutte à goutte, une solution de 24,3 g de chloroformiate d'éthyle dans 150 ml d'acétone; on a agité le mélange à 0°C pendant 1 heure, puis on a ajouté progressivement la solution formée à partir de 16 g d'azothydrate de sodium et 40 ml d'eau. On a agité encore à froid le mélange réactionnel pendant 1 heure après la fin de l'addition et on a essoré 27,8 g, soit 71 %, d'un solide incolore correspondant à l'azide cherché, lequel s'est décomposé par fusion à partir de 150°C. L'évaporation de l'acétone des eaux-mères, au bain marie sous pression réduite, et en ne dépassant pas 30°, a fourni une nouvelle quantité du composé attendu qui est alors coloré en jaune. Ce produit a

été utilisé dans la suite de la synthèse sans autre purification.

D) Hydroxy-1 méthyl-5 acétylamino-6 isoquinoléine ou méthyl-5 acétylamino-6 isoquinolone-1 de formule (14)

Le mélange constitué par 1,5 l de diphényléther et 33 g de tributylamine a été chauffé à 240°C dans un tricol de 4 l. On a mis 41 g de l'azide de formule (13) préalablement séché au dessiccateur sous vide en suspension dans 300 ml de diphényl-éther et on l'a ajouté à la solution précédente maintenue sous violente agitation, par petites portions mais aussi rapidement que possible et en continuant à chauffer pour éviter que la température descende en-dessous de 220°C.

Après la fin de l'addition, on a chauffé de nouveau à 240°C et on a maintenu le mélange réactionnel à cette température pendant 10 minutes, puis on l'a laissé refroidir. Le précipité formé a été filtré, lavé au benzène et recristallisé dans l'éthanol, dans lequel il est très peu soluble, pour donner 25 g, soit 69 %, de microcristaux incolores, infusibles à 320°C.

Analyse :	$C_{12}H_{12}N_2O_2$	C	H	N
	Calculé %	66,65	5,59	12,96
	Trouvé %	66,98	5,64	12,87

E) Méthyl-5 amino-6 isoquinolone-1 de formule (15)

Le mélange formé par 500 ml d'éthanol, 100 ml d'acide chlorhydrique et 25 g du composé de formule (14) a été chauffé à reflux pendant 2h 30. L'évaporation du solvant a fourni un résidu que l'on a repris dans de l'eau chaude, filtré, et l'alcanilisation du filtrat par la soude N a fourni 16,3g, soit 81 %, d'un composé qui a recristallisé sous forme d'aiguilles incolores, point de fusion = 260-285°C avec décomposition.

Analyse :	$C_{10}H_{10}N_2O$	C	H	N
	Calculé %	68,95	5,79	16,08
	Trouvé %	68,97	5,83	15,85

F) Méthyl-5 / (nitro-3' pyridyl) -4' amino 7-6 isoquinolone-1 de formule (16)

On a dissous 17,4 g du composé de formule (15) dans 400 ml de diméthyl formamide (DMF); on a ajouté une solution de 15,9 g de la chloronitro-pyridine de formule (3) dans 100 ml de DMF et on a laissé ce mélange à la température ambiante pendant 12 jours. Le précipité formé a été essoré; l'évaporation du solvant sous pression réduite a redonné une nouvelle quantité de solide et l'ensemble de ce dernier a été repris dans de l'eau chaude puis

alcalinisé par de la soude N. Le précipité formé a recristallisé dans le DMF en donnant 21,3 g (72 %) de prismes jaunes infusibles à 330°C et correspondant au composé de formule 16.

5	Analyse : $C_{15}H_{12}N_4O_3$	C	H	N
	Calculé %	60,80	4,03	18,91
	Trouvé %	60,46	4,08	18,62

Lorsque la réaction a été effectuée en présence d'un excès de 1 à 3 % de la nitro-3-chloro-4-pyridine de formule (3), à côté du produit décrit ci-dessus on a isolé de 10 à 15 % d'un produit secondaire, moins soluble dans le DMF, et qui a recristallisé dans ce solvant en prismes rouges, infusibles à 330°C. Il correspond à la nitro-3 amino-4 di [N-1,N-4 (hydroxy-1' méthyl-5' isoquinolyl-6') pyridine].

15	Analyse : $C_{25}H_{19}N_5O_4, 1/2 H_2O$	C	H	N
	Calculé %	64,95	4,35	14,38
	Trouvé %	64,72	4,19	14,28

G) Méthyl-5 [(amino-3'pyridyl)-4' amino]-6 isoquinolone de formule (17)

On a dissous 12,6 g du dérivé nitré précédent dans 500 ml d'acide acétique; on a ajouté 0,6 g de charbon palladié à 10 % et agité en atmosphère d'hydrogène jusqu'à absorption de la quantité théorique d'hydrogène. On a ajouté 500 ml d'acide acétique, chauffé pour dissoudre le précipité formé, on a filtré le catalyseur, évaporé le solvant et on a dissous le résidu dans l'eau. Après alcalinisation jusqu'à pH 9, le précipité a été filtré et recristallisé dans de l'acétonitrile pour donner 10,2 g (84,3 %) de microcristaux crèmes, correspondant à l'hydrate de l'amine de formule (17).

30	Analyse : $C_{15}H_{16}N_4O_2$	C	H	N
	Calculé %	63,86	5,67	19,71
	Trouvé %	63,84	5,44	19,47

H) [(Dihydro-1',2' oxo-1' méthyl-5' isoquinolyl)-6']-1 triazolo [4,5-c] pyridine de formule (18)

Dans un tricol de 500 ml muni d'un thermomètre, d'un agitateur mécanique et d'une ampoule à brome, on a mélangé 10,2 g de l'amine de formule (17) et 70 ml d'acide acétique; on a refroidi le mélange réactionnel aux environs de 0° et on a ajouté progressivement une solution de 3 g de nitrite de sodium dans le minimum d'eau. On a continué l'agitation pendant 1 h en laissant le mélange réactionnel revenir à la température ambiante; on a

filtré ensuite le précipité, on l'a lavé à l'eau et séché. On a obtenu ainsi 8,3 g (83,5 %) de microcristaux incolores; point de fusion 309-310°C, correspondant à l'hydrate de la triazolopyridine de formule (18).

5	Analyse : $C_{15}H_{15}N_5O_2$	C	H	N
	Calculé %	61,01	4,44	23,72
	Trouvé %	60,92	4,15	23,44

I) dihydro-1,2 oxo-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole de formule XIX avec R = OH : composé 19

- 10 On a ajouté 8g de triazolopyridine de formule (18) à 60 g de phénanthrène fondu, puis chauffé à 340°C, et on a maintenu le mélange réactionnel sous agitation à cette température pendant 20 minutes puis laissé refroidir. Le phénanthrène a été extrait à l'éther de pétrole ou à l'hexane et le résidu insoluble a été
- 15 recristallisé dans du DMF pour donner 4,2 g (58 %) de microcristaux gris infusibles à 310°C et correspondant à l'hémihydrate du produit de formule (19).

	Analyse : $C_{15}H_{11}N_3O,1/2H_2O$	C	H	N
	Calculé %	69,75	4,68	16,27
20	Trouvé %	70,04	4,40	16,14

EXEMPLE 5

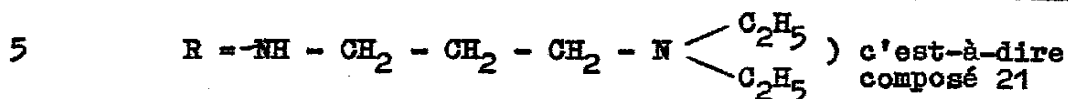
Chloro-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole
[composé de formule XIX avec R = Cl : composé 20]

- 25 On a mélangé 1,5 g du dipyrido indole (composé 19) avec 250 ml d'oxychlorure de phosphore contenant 1,5 g de pentachlorure de phosphore et on a chauffé à reflux pendant 20 heures. L'excès d'oxychlorure et de pentachlorure a été éliminé au bain-marie sous pression réduite et le résidu a été repris dans l'eau tiède,
- 30 en plusieurs fois et en agitant à chaque reprise pendant 1 heure, jusqu'à épuisement. Les filtrats aqueux réunis et refroidis ont été neutralisés par une solution de carbonate de sodium ou de potassium et le précipité formé, essoré puis séché, a été recristallisé dans du DMF en donnant 875 mg -soit 54 % - de micro-
- 35 cristaux jaunes, infusibles à 320°C et correspondant à l'hémihydrate du dérivé chloré 20.

	Analyse : $C_{15}H_{10}N_3Cl,1/2H_2O$	C	H	N	Cl
	Calculé %	65,10	3,97	15,19	12,84
	Trouvé %	64,77	3,92	14,97	13,21

EXEMPLE 6

(γ -diéthylaminopropyl)-amino-1-méthyl-5-dipyrido
[4,3-b] [3,4-f] indole (composé de formule XIX avec

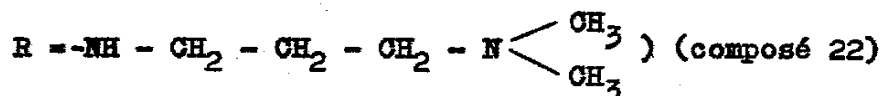


Le mélange, constitué par 875 mg du dérivé chloré obtenu selon l'exemple 5 ci-dessus et 10 g de γ -diéthylaminopropylamine, a été chauffé au bain d'huile à 150°C pendant 30 minutes et l'excès d'amine a été éliminé au bain-marie sous pression réduite. Le résidu a été extrait trois fois par 60 ml de benzène bouillant et le résidu insoluble a été repris dans le chloroforme en présence de soude. Après lavage de la couche chloroformique à l'eau, le chloroforme a été évaporé, le résidu a été repris avec le benzène
15 précédemment utilisé et le tout a été concentré jusqu'à environ 50 ml et refroidi. La filtration du solide en suspension a fourni 180 mg (15 %) de microcristaux jaunes, point de fusion = 215-218°C, correspondant à l'amine attendue cristallisée avec une molécule d'eau.

20	Analyse : $C_{22}H_{27}N_5, H_2O$	C	H	N
	Calculé %	69,63	7,70	18,46
	Trouvé %	70,02	7,39	18,29

EXEMPLE 7

25 (γ -diméthylaminopropyl)-amino-1 méthyl-5 dipyrido
[4,3-b] [3,4-f] indole (composé de formule XIX

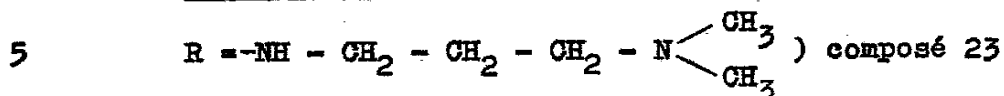


On a procédé comme dans le cas précédent en chauffant à l'ébullition de la diméthylaminopropylamine pendant 7 heures. Après un traitement identique à celui mentionné ci-dessus, le produit a été recristallisé dans le benzène pour donner des microcristaux jaune pâle, point de fusion : 240°C, correspondant à l'hémihydrate du produit attendu.

35	Analyse : $C_{20}H_{23}N_5, 1/2 H_2O$	C	H	N
	Calculé %	70,09	7,00	20,44
	Trouvé %	70,27	6,85	20,13

EXEMPLE 8

(β -diméthylaminoéthyl)-amino-1 méthyl-5 dipyrido
[4,3-b] [3,4-f] indole (composé de formule XIX,



On a procédé comme dans les exemples 6 et 7 précédents en chauffant le composé chloré 20, dans la β -diméthylaminoéthylamine à l'ébullition pendant 15 h. Après un traitement identique à ceux mentionnés dans les deux cas précédents, le produit a été recristallisé puis repris dans l'éthanol chlorhydrique pour former le trichlorhydrate correspondant, lequel recristallise dans l'éthanol en prismes incolores point de fusion 262-269°, correspondant au dihydrate du trichlorhydrate du composé 23 attendu

15 C₁₉H₂₁N₅. Rendement 37 %

Analyse : C ₁₉ H ₂₁ N ₅ , 3HCl 2H ₂ O	C	H	N	Cl
Calculé %	49,08	6,02	15,07	22,93
Trouvé %	49,58	5,77	14,52	23,26

Essais pharmacologiques

20 Les essais ci-après ont été réalisés, sauf stipulation contraire, sur des lots de 10 souris.

Essai 1 :

Etude des propriétés antitumorales des composés de l'invention sur la leucémie L 1210

25 On a déterminé les propriétés antitumorales des composés selon l'invention par leur action curative sur la leucémie expérimentale greffée L 1210.

Cette leucémie a été entretenue sur des souris CBD 1 (C 57 B 16 x DBA/2). F^m. Les composés à tester ont été injectés par voie intrapéritonéale un ou plusieurs jours après la greffe des cellules (1 seule injection). Les résultats obtenus rassemblés dans le tableau I ci-après sont exprimés en pourcentage d'augmentation du temps de survie (ILS %) et en pourcentage du nombre de cellules tuées par le composé à tester, la survie des animaux étant proportionnelle au nombre de cellules injectées.

Le pourcentage du taux de survie ILS % (Cancer. Res. 1971, 31, 1883-1887) est le rapport :

$$\text{ILS \%} = \frac{s^t - s^c}{s^c} \times 100 ; \quad \begin{matrix} s^t = \text{survie des animaux traités} \\ s^c = \text{survie des animaux témoins} \end{matrix}$$

40 Les résultats du tableau I montrent que les produits selon

l'invention possèdent des propriétés antitumorales.

Essai 2 :

Leucémie viro-induite : Leucémie de Friend

- On a recherché le pouvoir protecteur des composés selon
- 5 l'invention sur la leucémie de Friend, inoculée à des souris DBA2 âgées de 5-6 semaines. L'inoculum viral a été réalisé à partir d'un homogénat de rate leucémique (p/volume) dilué au 1/250 dans du tampon phosphate isotonique sans Ca^{++} ni Mg^{++} (PBS), correspondant à 100 SD 50 (c'est-à-dire à la dose de virus qui pro-
- 10 voque une splénomégalie chez 50 % des souris inoculées).

- Le virus a été injecté par la voie intrapéritonéale et sous un volume de 0,2 ml. Le produit à tester a été injecté 5 heures après le virus ou 1 jour après le virus à la dose indiquée dans un volume de 0,1 ml (voie I.P.). Chaque groupe de vingt sou-
- 15 ris témoins a reçu le virus et un placebo ou le produit à tester, 10 souris ont été sacrifiées au 21^{ème} jour, et la rate prélevée et pesée. Les souris étaient considérées comme leucémiques lorsque le poids de leur rate dépassait 200 mg. Pour les 10 souris, on a déterminé la survie des animaux.

- 20 Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau II. Ces résultats montrent que ces produits possèdent une activité antivirale en plus de leur activité antitumorale.

Essai 3 :

Etude du développement du sarcome viro-induit de Moloney

- 25 L'injection de virus de Moloney [C Jasmin et al. J. Nat. Cancer Inst. 1974 53 469-474] par la voie intramusculaire à des souris nouveau-nées a conduit après 10 jours à la formation d'un sarcome. L'apparition de la tumeur était proportionnelle à la dose de virus injectée. L'inoculum viral a été constitué par un bro-
- 30 yat de tumeur dilué au 1/250, ce qui correspond à 10 TID 50, c'est-à-dire à la dose de virus qui provoque l'apparition de tumeurs chez 50 % des animaux infectés. A cette dose, 80 à 100 % des animaux ont développé une tumeur, et 100 % des survivants sont devenus leucémiques. L'expérience a donc consisté à noter le
- 35 nombre des souris présentant des tumeurs, la régression ou non de ces tumeurs et enfin à sacrifier les animaux survivants après 2 mois et à noter la présence de splénomégalie ou non (témoin d'une leucémie). Le virus a été inoculé à des souriceaux nouve-
- 40 reçu le jour suivant (J + 1) ou 5 heures après l'injection (JO + 5h)

le produit à tester par la voie intrapéritonéale. Les résultats obtenus sont les suivants :

- Témoins virus : 80 % des souriceaux ont présenté des tumeurs
10 % des tumeurs ont régressé
- 5 30 % des animaux ont survécu et ont tous présenté une leucémie.
- Composé de l'exemple 6 : injection à J + 1; 1 µg/souriceau (0,5 mg/kg)
- 70 % des souriceaux ont présenté des tumeurs
- 10 90 % des tumeurs ont régressé
90 % des animaux ont survécu
0 % de leucémie
- HUM : injection à J + 1; 5 µg/souriceau (2,5 mg/kg)
- 20 % des animaux présentent une tumeur
- 15 100 % régressent
10 % des souris sont leucémiques
- HUM : injection à J + 1, 1 µg/souriceau (0,5 mg/kg)
- 30 % des animaux présentent une tumeur
- 90 % régressent
- 20 90 % survivantes
33 % sont leucémiques
- Témoins virus
- 90 % des animaux présentent une tumeur
- 40 % des tumeurs ont régressé
- 25 90 % des souris ont survécu
45 % des souris sont leucémiques
- Composé de l'exemple 6: injection à JO + 5h; 1 µg/souriceau (0,5 mg/kg)
- 5 % des animaux présentent une tumeur
- 30 100 % ont régressé
100 % ont survécu
40 % présentent une leucémie
- Composé de l'exemple 1: injection à JO + 5h; 1 µg/souriceau (0,5 mg/kg)
- 50 % des animaux présentent une tumeur
- 35 30 % régressent
75 % survivent
65 % sont leucémiques.

Essai 4 :Recherche de la toxicité

On a recherché la dose toxique sur des souris adultes (C 57, BL 6 x DBA/2)F1 et sur des souris nouveau-nées des composés de l'invention par injection par voie intrapéritonéale.

Les résultats obtenus sont donnés ci-après :

1 - Sur souris F1 adulte (C 57 BL 6 x DBA/2) F1 (voie intrapéritonéale)

a) Composé de l'exemple 1 :

- 10 Injection de 2 mg/souris (80 mg/kg) = 5 mortes / 6
 1 mg/souris (40 mg/kg) = 1 morte / 8
 0,5 mg/souris (20 mg/kg) = 1 morte / 6

b) composé de l'exemple 6 :

- Injection de 1 mg/souris (50 mg/kg) = 1 morte / 3
 15 0,6 mg/souris (30 mg/kg) = 5 mortes/10
 0,5 mg/souris (25 mg/kg) = 0 morte / 5
 0,3 mg/souris (15 mg/kg) = 0 morte / 6

la DL_{50} du composé de l'exemple 6 est donc de 30 mg/kg.

2 - Sur souris nouveau-née (voie intrapéritonéale)

- 20 5 µg : 2,5 mg/kg = 3 mortes/8 aspect malin des souris
 HUM 10 µg : 5 mg/kg " " " "

Ces résultats montrent que la dose toxique du composé de l'exemple 6 est supérieure à 2,5 mg/kg de souris.

Essai 5 :25 Effet cytotoxique in vitro

Les effets cytotoxiques des composés selon l'invention ont été testés sur des cultures in vitro de cellules de hamster, d'homme et de souris.

- 30 En particulier, la lignée BHK21 de cellules de hamster et un clone dérivé de cette lignée transformé par le virus du sarcome du hamster (clone HS5) ont été utilisés.

- Après détachement par la trypsine, les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de Pétri en plastique de 35 mm de diamètre à la concentration de $2 \cdot 10^5$ cellules/boîte, dans un milieu de culture de "Eagle" additionné de "Bactotryptophosphate Broth" "Difco" et de 10 % de sérum de veau [M. STOKER et I. MACPHERSON Virology 14, 1961, 359].

- Après 5 heures, les cellules ont été attachées sur un support plastique, et on a ajouté les produits à tester dont les dilutions ont été faites dans de l'eau ou dans le DMSO (diméthyl-
- 40

sulfoxyde) si le produit est peu soluble dans l'eau. Dans ce dernier cas, un témoin a été effectué avec la même concentration finale de DMSO dans le milieu de culture.

L'état des cellules a été examiné 24, 48 et 72 heures après.

- 5 Les résultats (tableau III) montrent clairement que les produits sont nettement cytotoxiques à des concentrations comprises entre 0,2 et 10 μ M, et que le produit le plus actif, c'est-à-dire le composé de l'exemple 6, est aussi actif que les dérivés déjà connus, l'acétate de méthyl-2 hydroxy-9-ellipticinium et 9-
10 hydroxyellipticine.

Les effets sur les 2 types de cellules, normal et transformé, sont similaires.

Essai 6 :

Action sur les synthèses macromoléculaires

- 15 L'action des composés selon l'invention a été étudiée par l'incorporation de précurseurs marqués par des isotopes radioactifs :

la thymidine-méthyle C^{14} pour étudier la synthèse de DNA

l'uridine 3H pour celle du RNA

- 20 la valine 3H pour celle des protéines

Ces précurseurs ont été donnés pendant une durée de 30 mn à des temps variables après l'addition du produit à tester.

- L'incorporation est mesurée après lyse des cellules pour 1 % de dodécylsulfate de sodium et précipitation par 5 % d'acide
25 trichloroacétique. Le précipité acidosoluble est recueilli sur des filtres en fibre de verre Whatman GF/A. Les filtres sont séchés et comptés dans un spectromètre à scintillation liquide.

Le tableau IV donne les résultats typiques pour le composé de l'exemple 1 diméthyl-5,11 dipyrrodo [4,3-b] [3,4-f] indole.

- 30 On constate que ce composé diminue très rapidement, dès les premières heures de son addition, les synthèses de DNA et de RNA, et, à un degré moindre, la synthèse des protéines.

Des expériences réalisées sur des cellules synchronisées [G. TORPIER, J. GRUEST & L. MONTAGNIER Experimental Cell

- 35 Research 85, 1974, 437] ont montré que le composé de l'exemple 1 arrête dès les premières minutes de son addition la répllication du DNA, à la fois dans ses phases d'initiation et d'élongation.

Essai 7 :

Etude in vitro de l'activité antitumorale

- 40 Cette activité a été mesurée sur une lignée tumorale

dérivée de la leucémie murine due au virus de C. Friend.

Les cellules tumorales se multiplient en suspension dans un milieu de "RPMI 1640" [Catalogue de GIBCO Bio-cult. Ltd Washington road Sandyford industrial Estate PAISLEY PA 3 4EP

- 5 RENNESHIRE SCOTLAND / additionné de 20 % de sérum de veau embryonnaire, de pénicilline et de streptomycine. Le temps de doublement de ces cellules est de 11 heures. Le "growth fraction" est égal à 1 ou très voisin de 1 (toutes les cellules sont dans le cycle). Les cultures sont repiquées au temps $t = 0$ à la concentration de $2 \cdot 10^5$ cellules par ml dans des boîtes "Falcon" contenant 4 ml de milieu. Vingt quatre heures plus tard, le produit à tester a été ajouté, c'est-à-dire à un moment où les cultures sont en phase exponentielle de croissance. Vingt quatre heures après l'addition du produit, les cellules ont été dénombrées et le pourcentage des cellules vivantes déterminé par un test d'exclusion au bleu "trypan". On peut donc définir deux doses : (1) une dose létale 50 %, et
- 15 (2) une dose létale 100 %.

20		DL 100	DL 50	Activité [*] = $\frac{DL\ 50\ HUM}{DL\ 50\ X}$
	Produit de référence : acéto-méthylate-hydroxy-9-ellipticinium (HUM)	$7 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$	1
25	composé de l'exemple 1	$5 \cdot 10^{-7}$	10^{-7}	3
	composé de l'exemple 2	$5 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	0,2
	composé de l'exemple 5	$6 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	0,15
30	composé de l'exemple 6	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-6}	0,3
	composé de l'exemple 7	$5 \cdot 10^{-8}$	10^{-8}	20

*Activité : ce chiffre (rapport de la DL_{50} de HUM à la DL_{50} du produit testé) tout à fait arbitraire, permet d'avoir une idée des activités des différents produits en les comparant au HUM, produit le plus actif dans la série des ellipticines.

35 Essai 8 :

Toxicité aiguë in vivo

Les produits à tester ont été injectés par voie intrapéritonéale dans des groupes de 10 souris à des dilutions variées. Chaque jour, le nombre d'animaux morts a été relevé. Si les doses

sont bien choisies, on a pu définir pour chaque produit une dose létale 100 % et une dose létale 50 %. Cette étude est limitée à deux mois. Deux lignées de souris isogéniques ont été systématiquement utilisées : C3H/He et ICFW.

5

	Lignée de souris	DL ₁₀₀	DL ₅₀
Composé de l'exemple 1	C3H ICFW	200 mg/kg >200 mg/kg	100 mg/kg 150 mg/kg
Composé de l'exemple 6	C3H ICFW	35 mg/kg 25 mg/kg	20 mg/kg 15 mg/kg

10

Essai 9 :

Action sur des cellules tumorales chloromonocytaires

On a déterminé dans cet essai l'action des produits selon l'invention sur des cellules tumorales chloromonocytaires selon le test de chloroleucémie de la souris (souris ICFW, lignée CFW co-sanguine) isolée à l'Unité 22 (B. TAMBOURIN et F. WENDLING) de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.) chez une souris injectée avec un variant du virus de Friend.

20

La tumeur tue tous les animaux injectés en $19,3 \pm 2$ jours. Cette tumeur se développe sous forme ascitique semi solide; le péritoine est envahi, à la fois par des masses tumorales solides et des cellules en suspension dans le liquide ascitique. La tumeur est transmise par les cellules de la suspension qui donnent naissance aux masses tumorales et aux cellules ascitiques.

25

	Temps moyen de survie sans traitement	Temps moyen de survie après traitement
30 composé de formule 8 (40 mg/kg 6 heures après la greffe)	$18,5 \pm 2$ j	$25,3 \pm 3,1$ j
composé 21 (1 mg/kg 24 heures après la greffe)	$18,9 \pm 1,8$ j	$29,0 \pm 3,0$ j

35 Essai 10

Comparaison de l'activité antitumorale du composé selon l'exemple 6 à celle des produits connus.

On a injecté à des souris leucémiques L 1210 le composé de l'exemple 6, c'est-à-dire le (γ -diéthylaminopropyl)-amino-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole ou des composés

connus 1 ou 3 jours après la greffe des cellules aux doses indiquées dans les tableaux V à VII et on a mesuré la moyenne du temps de survie (MTS) et le pourcentage d'augmentation du temps de survie (ILS %).

- 5 On peut trouver des indications concernant les produits connus mis en oeuvre dans cet exemple et notamment leurs propriétés antitumorales, leurs effets secondaires ainsi que leur utilisation chez l'homme dans "La Chimiothérapie des Cancers" de G. MATHE et Y. KENIS Expansion Scientifique Française, 3e édition, 10 Paris 1975.

Essai 11

- On a injecté à des souris leucémiques L 1210 le composé de l'exemple 7 (composé 22) c'est-à-dire le (γ -diméthylamino-propyl) amino-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole, un 15 jour après les greffes des cellules (jour J + 1) aux doses indiquées dans le tableau VIII et on a mesuré la moyenne du temps de survie (MTS) et l'augmentation du temps de survie (ILS %).

- On a réalisé cet essai avec 10^3 , 10^4 et 10^5 cellules leucémiques au jour J. On a également réalisé cet essai avec le composé de l'exemple 6, c'est-à-dire le (γ -diéthylaminopropyl)amino-1 20 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole (composé 21).

- Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau VIII. On a également noté dans ce tableau le nombre de souris survivantes; une souris est considérée comme survivante si elle a survécu 25 au moins 2 à 3 mois après l'inoculation des cellules leucémiques.

Essai 12 :

Etude de la protection des souris leucémiques (cellules greffées L 1210) par une dose unique ou une dose fractionnée

- On a injecté à des souris leucémiques L 1210 le composé de 30 l'exemple 6, c'est-à-dire le (γ -diéthylaminopropyl)amino-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole, en une seule injection (10 mg/kg au jour J + 3) ou par doses fractionnées (2,5 mg/kg chaque injection aux jours J + 3, J + 4, J + 5 et J + 6).

- Les résultats consignés dans le tableau IX montrent qu'une 35 dose unique possède une activité antitumorale plus élevée que la même dose injectée en 4 fois.

Essai 13 :

Carcinome de Lewis

Pour cet essai on peut se référer aux ouvrages ci-après:

- 40 - Carcinome pulmonaire de Lewis (3LL) SUGIURA K. et STOCK

C.G. Cancer Res., 1955 15 38-51.

- La Chimiothérapie des cancers de G. MATHE et YKENIS
Expansion Scientifique Française, 3e édition, Paris 1975.

- SCHEPARTZ S.A. Screening, 1971, Cancer Chemiother.

5 Rep. Part 3 vol 2 p 3

Selon cet essai on injecte par voie intramusculaire à des souris (BDF₁) des cellules (10⁶ cellules) prélevées à une souris porteuse de tumeur. Les souris développent 10 à 15 jours après l'inoculation une tumeur au lieu d'injection. D'autre part ces
10 cellules métastasent au poumon en formant des colonies sur la surface pulmonaire. On peut donc juger sur des souris ainsi traitées de l'effet antitumoral et antimétastatique d'un produit.

Recherche de l'effet antimétastatique des composés des exemples 6 et 7 de l'invention

15 10⁶ cellules prélevées à une souris porteuse de tumeur ont été injectées par voie intramusculaire (patte gauche) à des lots de 10 souris et les composés à tester ont été inoculés par voie intrapéritonéale au jour J+5 par injection unique ou fractionnée. On a déterminé la moyenne du temps de survie (MTS) et
20 l'augmentation du temps de survie (ILS %)

	injection nbr	MTS	ILS %
25 Témoins non traités		25	
souris traitées avec le composé de l'exemple 6	4 injections J+5+6+10+11 2,5 mg/kg chacune	27,4	9,6
30 "	1 injection J+5 10 mg/kg	32,7	30,8
souris traitées avec le composé de l'exemple 7	J + 5 5 mg/kg	27,44	9,8

On peut conclure à une action protectrice des composés des exemples 6 et 7 en ce qui concerne l'invasion pulmonaire métastatique du poumon. En effet, une souris traitée et une souris non traitée ont été sacrifiées au jour J+22 et les métastases pulmonaires comptés; on a compté 77 métastases chez la souris non traitée et 35 chez la souris traitée au jour J+5 (une seule injection) avec le composé selon l'exemple 6.
35

TABLEAU I

Etude des propriétés antitumorales des composés selon l'invention sur la leucémie L 1210

Composé testé	Expérience	Nombre de cellules injectées	Quantité en mg/souris (mg/kg)	ILS %	Nombre de cellules retrouvées	Nombre de cellules tuées	Souris survivantes
Composé de l'exemple 1 (formule 8)	expérience n° 1 J+2	10 ⁶	1 mg/souris (50mg/kg)	34,32	10 ⁵	90 %	0
		10 ⁵		15,73	40.000	60 %	0
		10 ⁴		14,78	6000	40 %	
		10 ³		3	800	20 %	1/10
"	expérience n° 2 J + 1	10 ⁶	1 mg/souris (50 mg/kg)	47,3	8000	99 %	
		10 ⁵		38,1	2000	98 %	
		10 ⁴		11,8	5000	50 %	
composé de l'exemple 1 (formule 8)	expérience n° 3		0,1 mg/souris 0,05 mg/souris	pas de différence significative avec les témoins 10 ⁴ cellules 10 ³ cellules			
composé 20 (exemple 5)			0,1 mg/souris	0,1 mg toxique et pas de différence avec les témoins 10 ⁴ cellules 10 ³ cellules			

TABLEAU I (suite)
Etude des propriétés antitumorales des composés selon l'invention sur la leucémie L 1210

Composé testé	Expérience	Nombre de cellules injectées	Quantité en mg/souris (mg/kg)	ILS %	Nombre de cellules retrouvées	Nombre de cellules tuées	Souris survivantes
Composé 21 (exemple 6)	produit injecté I.P. J+1 III	10 ⁴	0,1 mg/souris (0,5 mg/kg)	33,3	60	99,94	1/10
			0,1 mg/souris (5 mg/kg)	11,5	10 ³	90	
		10 ³	0,01 mg/souris (0,5 mg/kg)	17,4	80	92	5/10
			0,1 mg/souris (5 mg/kg)	23,2	40	96	
HUM ^{II}	produit injecté I.P. J+1 III	10 ⁴	0,1 mg/souris (5 mg/kg)	22,6	400	96	1/10
		10 ³	0,1 mg (5 mg/kg) 0,1 mg (5 mg/kg)	22,15	60	94	3/10

^{II} HUM : acétate de 2-N-méthyl-9-hydroxy-ellipticinum

~~III~~ J+1 ou J+2 injection un ou deux jours après la greffe des cellules.

TABEAU II
Leucémie viro-induite: leucémie de Friend

Souris	Virus	Produit à tester	Moyenne du temps de survie **	***	IIS %: Poids des rates au 21ème jour en mg
témoin	* VFA 1/250 (1)	-	31,7 (26-47)		2519 mg
	VFA 1/250 (2)	-	28 (14-47)		(2866-1919)
Traitée	VFA 1/250	composé de l'exemple 1 (formule 8) 5h après le virus			
		0,1	47,6 (26-78)	59,5	2013 mg (887 - 2793)
		0,5	34,2 (22,54)	14,6	(1803 mg) (718-2635)
		1 mg	41,7 (14-81)	39,7	959,6 mg (373-1230)

Souris DBA2 mâles âgées 5-6 semaines

Expérience du 4.8.76 : * VFA : virus de Friend anémié injecté par voie I.P. 0,2 ml dilution 1/250 ~ 100 SD 50
 ** Moyenne du temps de survie, entre parenthèses, dates auxquelles la première et de la dernière souris sont mortes.

*** Augmentation du temps de survie pour 100.

TABLEAU III

Dose minimale entraînant une inhibition complète de la croissance
(+)

Cellules	Composé: exemple	Composé: exemple	Composé: exemple	Composé: exemple	Composé: exemple	HE*
	1	2	4	5	6	
C13/8	0,5 μ M	2	5	2	0,25	0,25
HS 5	0,5 μ M	2	5	2	0,25	0,25

* HE = 9-OH-hydroxy-ellipticine
ou acétométhylate-2-hydroxy-9-ellipticinium

TABLEAU IV

Inhibition des synthèses macromoléculaires par le composé de
l'exemple 1

Temps en heures du marquage après l'addition du produit	Incorporation dans le DNA (en % du témoin non traité)	Incorporation dans le RNA	Incorporation dans les protéines
0,5	41	33	40
3	14	13	37
6	6,3	3,7	16
9	6	9	17
24	4	31	17

- la concentration du produit est de 5 μ M
- les cellules HS5 ont été mises en culture 24 heures auparavant à la concentration de 5.10⁵ par boîte de Pétri de 60 mm.

TABLEAU V

Composé testé	Injection	Quantité par souris	Intervalle de mort	MMS	IIS %
Témoin 10 ⁴ cellules composé de l'exemple 6	J+1	0,2 mg	10 - 15 j	11	
composé de l'exemple 6	J+3	0,2 mg	6 - 1 souris vivante au 30ème jour	13,8	25,45
Thiotepa	J+3	0,1 mg	11 - 17	11	0
Mitomycine	J+3	0,016 mg	10 - 11	11,54	4,95
BONU	J+3	0,1 mg	10 - 15	11,1	0,9
Methotrexate	J+3	0,250 mg	10 - 12	15,9	44,62
Endoxan	J+3	4 mg	15 - 17	13 - 3 souris vivantes au 30ème jour/10	

TABLEAU VI

	Quantité en mg/souris	Injection	Intervalle de mort	MTS	IIS %
Témoin 10^5 cellules			9 - 10	9,06	
Thiotepa	0,1 mg	J+3	9 - 10	9,2	1,54
Mitomycine C	0,016 mg	J+3	9 - 10	9,06	0
BCNU	0,1 mg	J+3	8 - 9	8,8	0
Methotrexate	0,250 mg	J+3	12 - 14	12,62	39,35
Composé de l'exemple 6	0,2 mg	J+1	9 - 16	12,6	39,07
Endoxan	4 mg	J+3	10- 15	12,27	35,43
		J+3	15- 21	18,6	105,30

TABLEAU VII

Composé testé	Injection	Quantité	Intervalle de mort	MMS	IIS %
Témoin 10^5 cellules			10 - 11		
Composé de l'exemple 6	J+3	0,2 mg/souris	13 - 16	14,18	36,35
ON COVIN	"	0,5 µg/souris	10 - 13	10,8	3,85

TABLEAU VIII

Nombre de cellules L 1210 injectées au jour J		Composé utilisé	Quantité* in- jectée en mg/souris	MMS	ILS %	Nombre de souris survivantes
10 ³	Témoins	-	-	13		
		Exemple 7	0,1 mg/souris	15,4	50,5	3
		exemple 7	0,05 mg/souris	14,7	34,9	1
		exemple 6	0,2 mg/souris	15,3	25,4	7
		exemple 6	0,1 mg/souris	15	15,4	4
10 ⁴	Témoins	-	-	10,9	-	-
		exemple 6	0,1 mg/souris	18	65,1	1
		exemple 7	0,1 mg/souris	13,7	25,7	3
		exemple 7	0,05 mg/souris	14,7	34,9	1
10 ⁵	Témoins			9,05		
			0,1 mg/souris	13,8	52,5	
			0,05 mg/souris	11,6	28,1	

*dose en mg/souris x 50 = dose en mg/kg

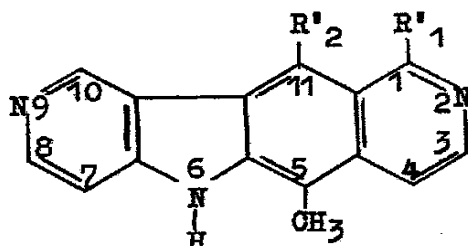
TABLEAU IX

Nombre de cellules L 1210 injectées au jour J		Quantité du composé de l'exemple 6 uti- lisée en mg/souris	Injection	MMS	ILS %	Souris survivantes
10 ⁴	Témoins	0,2 mg/souris 4 x (0,05 mg/souris)	unique à J+3 fractionnée J+3+4+5+6	11,9		
				14,2	19,32	1
				14,4	21	0
10 ⁵	Témoins	0,2 mg/souris 4x (0,05 mg/souris)	unique J+3 fractionnée J+3+4+5+6	10,4		
				14,18	36,35	
				13,4	28,85	

REVENDICATIONS

1. A titre de nouveaux produits, les dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indoles répondant à la formule :

5

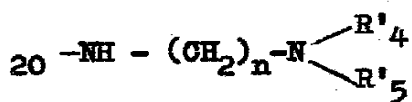


10 dans laquelle :

R'₁ est l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe alkyle, de préférence inférieur, alkylthio ou alcoxy, un halogène ou un groupe amino;

15 R'₂ est l'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur et les sels pharmaceutiquement acceptables de ceux-ci.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R'₁ est choisi parmi le groupe hydroxy, l'atome de chlore, les groupes



R'₄ et R'₅ étant des groupes alkyles, tels que méthyle et éthyle, et n est 2 ou 3 et

R'₂ est l'hydrogène

3. Composé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que R'₂ est le groupe méthyle et R'₁ est l'hydrogène.

25 4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les composés suivants:

- diméthyl-5,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;
- diacétate de tétraméthyl-2,5,9,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indolinium;

30 - l'acétate du diméthyl-5,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;
- le dichlorhydrate du diméthyl-5,11 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;

- le dihydro-1,2-oxo-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;

35 - le chloro-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;

- le (γ-diéthylaminopropyl)amino-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;

- le (γ-diméthylaminopropyl)amino-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole;

40 - le (β-diméthylaminoéthyl)amino-1 méthyl-5 dipyrido [4,3-b]

[3,4-f] indole.

5. Procédé pour l'obtention des composés selon la revendication 1; caractérisé en ce qu'il consiste :

(1) à faire réagir une amino-6 isoquinoléine avec la nitro-3 chloro-4 pyridine pour former la [(nitro-3' pyridyl)-4' amino] 6 isoquinoléine correspondante;

(2) à hydrogéner ladite isoquinoléine ainsi obtenue en le composé amino correspondant;

(3) à faire réagir le composé amino correspondant avec du nitrite de sodium pour former la triazolopyridine correspondante,

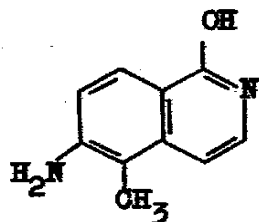
(4) à transformer la triazolopyridine ainsi obtenue en le dipyrido [4,3-b] [3,4-f] indole correspondant;

(5) éventuellement à former le sel pharmaceutiquement acceptable du dipyridoindole ainsi obtenu.

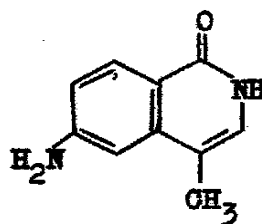
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'hydrogénation de l'étape (2) est réalisée en présence d'un catalyseur d'hydrogénation, tel que du charbon palladié.

7. Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que l'étape (4) est réalisée en présence d'un agent inerte, tel que la paraffine ou le phénanthrène, de point d'ébullition assez élevé pour autoriser la réaction par voie thermique.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que le produit de départ de formule 15 ou 15a (forme tautomère)



(15)



(15a)

est obtenu par le procédé qui consiste à transformer le groupe amino du méthyl-2 amino-3 benzonitrile en le groupe acétylamino pour former le composé de formule 10; à transformer ensuite le groupe cyano du méthyl-2 acétylamino-3 benzonitrile en le groupe aldéhyde et ensuite à condenser ce dernier avec l'acide malonique pour former l'acide de formule (12); à former ensuite l'azide correspondant (13); à effectuer une cyclisation pour former l'isoquinolone correspondante et enfin à éliminer le groupe protecteur du groupe amino pour obtenir la méthyl-5 amino-6 isoquinolone

de formule (15).

9. Composition pharmaceutique antitumorale et antivirale caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé selon la revendication 1, en combinaison avec
5 un véhicule pharmaceutiquement inerte.

10. Composition pharmaceutique selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une solution injectable par voie intraveineuse ou intramusculaire.

11. Application des composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 au traitement des cancers.
10

12. Produits intermédiaires nécessaires à la synthèse des produits selon l'une des revendications 1 à 4:

le méthyl-2 acétylamino-3 benzaldéhyde; l'acide méthyl-2 acétylamino-3 cinnamique; le méthyl-2 acétylamino-3 cinnamoylazide;
15 l'hydroxy-1 méthyl-5 acétylamino-6 isoquinoléine, l'hydroxy 1 méthyl-5 amino-6 isoquinoléine et sa forme tautomère.